



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

FR00/02193

モケリ

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 0 7 AOUT 2000

Pour le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle Le Chef du Département des brevets

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS CONFORMÉMENT À LA RÈGLE 17.1.a) OU b)

Martine PLANCHE

SIEGE

NATIONAL DE La propriete 26 bis, rue de Saint Petersbourg 75800 PARIS Cédex 08 Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30



Code de la proprieté intellectuelle-Livre V





26 bis, rue de Saint Pétersbourg 75800 Paris Cedex 08

n°92-1189

Téléphone: 01 53 04 53 04 Télécopie: 01 42 93 59 30

REOUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie	
Cet imprime est a remptir a l'encre noire en lettres	capitale

- Réservé a l'INPI -NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE DATE DE REMISE DES PIÈCES À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE 9909 N" D'ENREGISTREMENT NATIONAL Cabinet ARMENGAUD AINE DÉPARTEMENT DE DÉPÔT 75 **75 INPI PARIS** DATE DE DÉPÔT 29 JUL 1999 3, Avenue Bugeaud **75116 PARIS** 2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle n°du pouvoir permanent références du correspondant téléphone demande divisionnaire X brevet d'invention 01-45-53-05-50 demande initiale D.59837 certificat d'utilité transformation d'une demande de brevet européen certificat d'utilité nº brevet d'invention date X immédiat Établissement du rapport de recherche différé Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance X non Titre de l'invention (200 caractères maximum) Protéines recombinantes, et complexes moléculaires dérivés de ces protéines, analogues à des molécules impliquées dans les réponses immunitaires 3 DEMANDEUR (S) n" SIREN Forme juridique Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) Nationalité (s) Française **Pays** Adresse (s) complète (s) 3 rue Michel Ange **75794 PARIS CEDEX 16** FRANCE En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre oui 🔀 non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée 4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs requise pour la 1ère fois requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission **RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES** DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE nature de la demande date de dépôt pays d'origine DIVISIONS antérieures à la présente demande SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI (nom et qualité du signataire) Mandataire : Chan



BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE



DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Pétersbourg 75800 Paris Cédex 08

Tél.: 01 53 04 53 04 - Télécopie: 01 42 93 59 30

TITRE DE L'INVENTION: Protéines recombinantes, et complexes moléculaires dérivés de ces protéines, analogues à des molécules impliquées dans les réponses

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

immunitaires

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

Madame PEAUCELLE Chantal

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

GLAICHENHAUS Nicolas 88 Bd Mantega Righi 06100 NICE

MALHERBE Laurent 736 Chemin des Ames du Purgatoire Résidence le Goya 06560 VALBONNE

NOTA: A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Le 29 Juillet 1999

-- n°-92-1-189

Merey.

10

15

20

25

30

Protéines recombinantes, et complexes moléculaires dérivés de ces protéines, analogues à des molécules impliquées dans les réponses immunitaires.

L'invention se rapporte à des protéines recombinantes, et à des complexes moléculaires dérivés de ces protéines, analogues à des molécules impliquées dans les réponses immunitaires.

Elle concerne également une méthode de production de telles molécules et de tels complexes, ainsi que leurs applications, en particulier pour le diagnostic et en thérapeutique.

On connaît le rôle majeur, dans une réponse immunitaire, des molécules codées par le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH).

Ces molécules sont constituées de deux chaînes polypeptidiques : la chaîne lourde, et la chaîne légère.

Les molécules du CMH sont exprimées à la surface des cellules présentatrices (cellules dendritiques, lymphocytes B, macrophages) sous la forme de complexes moléculaires avec des peptides antigéniques, eux-mêmes dérivés de protéines extracellulaires ou intracellulaires.

La reconnaissance de ces complexes peptide/CMH par un récepteur spécifique exprimé à la surface des lymphocytes T est à l'origine de toute réponse immunitaire à médiation cellulaire.

Les molécules du CMH appartiennent à deux classes distinctes : celles de classe I, qui sont reconnues par des lymphocytes T CD8+ (cellules T cytotoxiques) et celles de classes II qui sont reconnues par des lymphocytes T CD4⁺ (cellules T auxiliaires).

10 Pour être utilisables comme sondes permettant de dénombrer et de mesurer la fréquence des lymphocytes T spécifiques d'un antigène donné, de telles molécules et complexes doivent être produits sous forme soluble. Ces mêmes molécules et complexes solubles peuvent être utilisés pour moduler les réponses immunes.

La possibilité d'utiliser des molécules solubles du CMH pour détecter des lymphocytes T CD8⁺ a été démontrée pour la première fois par Altman et al en 1996 (1). Depuis cette date, de nombreuses équipes ont utilisé cette stratégie pour dénombrer et caractériser le phénotype de lymphocytes T CD8⁺ réagissant avec des peptides viraux, bactériens ou dérivés d'antigènes tumoraux. Toutefois, l'application de cette stratégie pour la détection de lymphocytes T CD4⁺ s'est révélée problématique.

20

25

30

Dans la plupart des travaux publiés à ce jour, des systèmes d'expression bactériens ont été utilisés pour produire des molécules du CMH de classe I. Après incubation de ces molécules avec des peptides antigéniques, les complexes peptide/CMH ont été purifiés et obtenus sous forme de tétramères après incubation avec de la streptavidine. Cette dernière étape est rendue possible par l'addition à l'extrémité carboxy-terminale de la chaîne lourde du CMH d'un site de reconnaissance pour l'enzyme BirA, une enzyme bactérienne, qui est capable de catalyser l'addition d'une

5 molécule de biotine. D'autres équipes ont choisi de produire des dimères de molécules du CMH de classe I en utilisant le squelette d'un anticorps. Dans ce cas, la chaîne lourde du CMH a été liée à la chaîne lourde d'une immunoglobuline (Ig en abrégé) et la β-2-microglobuline liée à la chaîne légère.

10 Les régions Fc des chaînes lourdes s'associant par l'intermédiaire de ponts disulfures, les molécules produites sont des dimères de molécules du CMH.

Pour des raisons techniques, la préparation de sondes moléculaires se fixant sélectivement aux lymphocytes T CD4⁺ s'est avérée beaucoup plus difficile, vraisemblablement à cause de l'instabilité intrinsèque des molécules du CMH de classe II.

15

20

25

Des tétramères de molécules de classe II liées à un peptide antigénique, ou des dimères de ces molécules obtenus en utilisant le squelette d'un anticorps ont été produits.

Le problème de la stabilité et de l'affinité des récepteurs de lymphocytes T CD4⁺ pour leur ligand est résolu, conformément à l'invention, par l'utilisation de constructions assurant la formation de dimères donnant des complexes multivalents grâce à l'utilisation de molécules comportant plusieurs sites de liaison pour certaines régions des dimères.

De telles constructions sont envisageables aussi 30 bien pour des molécules de CMH de classe I que pour celles de classe II.

De manière avantageuse, de telles constructions sont suffisamment stables pour pouvoir être utilisées comme

5 sondes moléculaires ouvrant ainsi un large champ d'application.

Ces constructions sont également utilisables pour obtenir des analogues de récepteurs des cellules T capables de reconnaître spécifiquement de telles molécules.

10 L'invention a donc pour but de fournir des molécules recombinantes et des complexes recombinants correspondants, dans lesquels ces molécules sont associées à des peptides antigéniques, de grande stabilité et de forte affinité pour leur ligand.

15 Elle vise également leur production dans des cellules hôtes à l'aide de vecteurs d'expression appropriés.

L'invention vise en outre les applications immunologiques de ces complexes comme sondes moléculaires.

Ces dimères sont caractérisés en ce qu'ils comportent à l'extrémité carboxy-terminale de l'une ou des 2 chaînes, tout ou partie d'une région Fc d'une immunoglobuline.

25

30

"Partie d'une région Fc" désigne un fragment correspondant à un fragment naturel, ou modifié par rapport à un tel fragment naturel, par substitution et/ou par délétion et/ou par mutation, mais capable de se lier à une protéine possédant des sites de liaison pour la région Fc, telle que la protéine A ou la protéine G.

L'expression "capable de se lier" est illustrée par l'exemple 1C.

La région Fc correspond plus spécialement à tout ou partie du domaine CH_2 et/ou CH_3 . Ce domaine peut être modifié par rapport au domaine naturel, mais doit être capable, conformément à l'invention, de se lier à une protéine du type protéine A ou G possédant plusieurs sites de liaison pour la région Fc d'une Ig.

5

10

20

25

30

L'immunoglobuline comportant la région constante visée ci-dessus peut être une IgG, notamment les isotypes IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, une IgM, une IgA, une IgD ou une IgE.

Les protéines de l'invention sont plus particulièrement caractérisées en ce qu'elles comportent tout ou partie des chaînes α ou β des molécules du CMH.

De manière avantageuse, les chaînes α et β constituant le dimère comportent des glissières à leucine, ce qui favorise leur appariement.

De telles glissières à leucine sont par exemple décrites par Scott et al (2) ou Kalandadze et al (3).

L'invention vise en particulier les molécules recombinantes associées en plusieurs dimères et notamment en tétramères et tout spécialement en octamères.

De telles molécules recombinantes sont complexées avec une protéine naturelle ou artificielle comportant plusieurs sites de liaison pour les régions constantes des immunoglobulines et permettant ainsi de créer des multimères de dimères. On citera à titre d'exemple la protéine A communément isolée à partir de Staphylococus aureus, ou encore la protéine G de Streptococus (groupe C), ou des multimères de récepteur des régions Fc obtenus par recombinaison génétique.

Les molécules recombinantes telles que définies ci-dessus complexées à des peptides antigéniques constituent des analogues de CMH.

L'invention vise de tels complexes, caractérisés en ce qu'ils comportent à l'extrémité -NH $_2$ de la chaîne β , un peptide antigénique fixé par l'intermédiaire d'un bras flexible. Ce bras peut avoir une longueur variable et permet le positionnement du peptide antigénique dans le sillon formé par le ou chaque dimère.

10

20

25

30

De telles fixations sont décrites par exemple par 15 Kozono et al (4) et (5).

Les molécules définies ci-dessus sont obtenues avantageusement selon les techniques décrites dans les Manuels de Biologie Moléculaire pour la préparation des gènes recombinants et leur expression dans des cellules eucaryotes ou procaryotes. On se réfèrera ainsi par exemple aux ouvrages de Sambrook et al (6) ou de Ausubel et al (7).

Les séquences codant pour les fragments recombinants constitutifs des molécules définies ci-dessus sont introduites dans des vecteurs d'expression. On utilise généralement autant de vecteurs d'expression que de fragments. Mais il est également possible, en variante, d'utiliser un même vecteur pour plusieurs fragments.

Comme vecteurs d'expression, utilisera avantageusement des plasmides et notamment des plasmides possédant un marqueur de sélection. Des résultats d'expression satisfaisants ont été ainsi obtenus avec des plasmides capables de se répliquer dans des bactéries et comportant, comme marqueur sélection, de un gène résistance à un antibiotique.

Les promoteurs seront choisis de manière à permettre l'expression du gène recombinant dans le système d'expression utilisé. On citera à titre d'exemple le promoteur reconnu par la polymérase du bactériophage T4 ou, lorsqu'on utilise comme système d'expression des cellules de Drosophile, le promoteur du gène de la métallothionéine.

Comme systèmes d'expression eucaryote, on citera les systèmes baculovirus recombinants dans des cellules d'insecte, de cellules de Drosophile, des cellules de Hamster (lignée CHO) et des cellules de Singe (lignée COS). On peut également effectuer une expression dans des cellules de levure.

15

20

25

30

Comme systèmes d'expression procaryote, les bactéries sont largement utilisées, en particulier *E.coli*.

Les molécules recombinantes produites sont purifiées sur des colonnes d'immunoaffinité, notamment avec des anticorps monoclonaux ou polyclonaux, spécifiques des molécules d'intérêt, ou encore avec des matériaux supports comme des billes, notamment des billes d'agarose.

D'autres protocoles de purification peuvent être envisagés. En particulier, par exemple lorsque les molécules à purifier comportent 6 résidus histidine consécutifs, des billes d'agarose recouvertes de nickel peuvent être utilisées pour purifier les molécules.

Les molécules purifiées obtenues sont alors mises à incuber avec les protéines possédant les sites de liaison pour la région Fc.

Ces protéines sont avantageusement marquées aux fins de détection, par exemple par un fluorophore.

Lorsque la molécule obtenue ne comporte pas de peptide antigénique, et qu'on souhaite disposer de complexes peptide antigénique/analogue de CMH, on la fait incuber avec ce peptide in vitro.

L'étude des molécules recombinantes selon 10 l'invention a permis de mettre en évidence leur grande stabilité et une forte affinité dans les essais de reconnaissance immunologique.

L'invention fournit ainsi des outils de grand intérêt pour la modulation des processus immunologiques.

15

20

25

30

Elle vise en particulier l'utilisation des complexes peptide antigénique/analogues de CMH de classe II pour dénombrer et/ou purifier les lymphocytes T réagissant avec un antigène donné et pour caractériser le phénotype de ces cellules, c'est-à-dire déterminer ou identifier les molécules qu'elles sécrètent ou qu'elles expriment à leur surface. Cette détection est réalisée sur un prélèvement effectué sur un patient. Il peut s'agir d'un prélèvement sanguin, ou effectué sur des organes lymphoides secondaires, comme les ganglions lymphatiques, la rate, ou encore sur des tumeurs.

Ces molécules peuvent avantageusement être utilisées pour dénombrer ou pour purifier ces cellules à partir de suspensions cellulaires comme décrit ci-dessus.

Alternativement, elles peuvent être utilisées pour visualiser ces cellules sur des coupes cellulaires.

Il est ainsi possible de préciser le statut immunologique d'un individu.

Cette application revêt un grand intérêt pour le développement de vaccins contre certains agents pathogènes ou de vaccins anti-tumoraux.

5

10

15

20

25

30

l'efficacité sait que pour juger de le meilleur moyen consiste à vacciner un vaccin, devenir d'individus et à suivre le nombre de population lorsqu'elle est exposée à l'agent infectieux dans des conditions naturelles. Cette approche est toutefois difficile à cause notamment des coûts considérables qu'elle enqendre, et de la difficulté de trouver suffisamment de volontaires.

L'utilisation des complexes selon l'invention, en tant que sondes moléculaires se fixant sélectivement à des lymphocytes T CD4 de spécificité donnée, permet de comparer rapidement l'efficacité de différentes préparations vaccinales et de déterminer le nombre et les intervalles optimaux entre les rappels.

Dans une étude en pré-clinique, on inocule des individus avec des préparations vaccinales renfermant le ou les antigènes, puis on dénombre les cellules T présentes dans un prélèvement, réagissant avec des complexes selon l'invention. La réponse des individus permet d'apprécier la réaction vis-à-vis du peptide antigénique.

Cette application peut être également mise en oeuvre comme moyens prédictifs quant à l'état d'un patient, en dénombrant et en déterminant le phénotype de cellules T autoréactives chez des malades à risques.

L'invention permet ainsi de déterminer le stade d'avancement de la maladie chez des patients souffrant de

5 maladies auto-immunes ou d'évaluer l'efficacité de certains traitements ou d'interventions thérapeutiques.

L'invention vise également l'application desdits complexes multivalents définis ci-dessus dans le diagnostic et la mise au point de traitements de maladies auto-immunes.

10 Un certain nombre de maladies auto-immunes sont dues à la mobilisation de lymphocytes T auto-réactifs qui provoquent la destruction des tissus de l'organisme. Dans certains cas, par exemple chez les diabétiques, le diagnostic de la maladie n'est effectué que tardivement 15 lorsque les tissus sont déjà détruits. Pour empêcher la destruction des tissus, et bloquer le développement de la maladie, il est indispensable d'effectuer un diagnostic précoce. La possibilité de dénombrer, grâce à l'invention, les lymphocytes T auto-réactifs dans le sang des patients à 20 risque constitue une avancée considérable.

Prenant en compte que les lymphocytes T autoréactifs jouent un rôle déterminant dans le développement des maladies auto-immunes, de très nombreuses stratégies thérapeutiques visent à éliminer ces lymphocytes, ou à les empêcher d'exercer leur pouvoir pathogène, on mesurera l'intérêt de pouvoir dénombrer grâce à l'invention les lymphocytes T auto-réactifs dans le sang des patients traités, de comparer l'efficacité de différents traitements, et d'adapter le traitement en fonction de la réponse du malade.

25

30

Selon un autre aspect, l'invention vise l'application des complexes pour l'enrichissement en un type de cellules T donné.

Cette application permet de disposer de grandes quantités de cellules T spécifiques d'un antigène donné in vitro à des fins de thérapie cellulaire. Ces cellules peuvent être en effet ré-inoculées à des patients à titre préventif ou curatif. On peut là encore dénombrer et déterminer, avant l'inoculation, le phénotype des cellules T complexées.

L'invention vise encore l'application des molécules recombinantes multivalentes comme agents stimulants des cellules T.

15 Ces molécules peuvent être inoculées à un individu pour stimuler l'expansion et/ou l'activation de cellules T spécifiques d'un antigène donné en l'absence de toute autre cellule, en particulier de cellules présentatrices.

Cette utilisation est donc intéressante pour stimuler des réponses immunitaires insuffisantes par exemple vis-à-vis de complexes CMH/antigène tumoral.

20

Dans le cas de maladies infectieuses, on inocule in vivo les molécules recombinantes, le cas échéant après une étape de propagation préalable ex vivo.

- D'autres caractéristiques et avantages de l'invention sont donnés, à titre purement illustratif, dans les exemples qui suivent et en se référant aux figures 1 à 5, qui représentent respectivement
- la figure 1 représente la séquence de l'insert d'ADNc de 30 la chaîne α du CMH,
 - la figure 2, la construction plasmidique contenant l'insert d'ADNc de la figure 1,

- 5 la figure 3, la séquence de l'insert d'ADNc de la chaîne β du CMH,
 - la figure 4, la construction plasmidique contenant l'insert d'ADNc de la figure 3,
- la figure 5, la construction plasmidique détaillée de la 10 figure 4, et
 - la figure 6, un octamère peptide/CMH de classe II selon l'invention.

Exemple 1 : Production de complexes peptide/CMH de type II

1. Construction des plasmides recombinants

. Construction de l'ADNc codant pour la protéine
recombinante IAα^d/Fc (clone 461) et insertion dans
un plasmide

Cette construction est illustrée par la figure 1

20 qui donne la séquence d'ADNC, de la position 420 à 1940, et celle du peptide codé (437-1921) (SEQ ID N° 1).

L'ADNC comprend, ligués entre eux, successivement, les fragments codant pour le peptide signal d'IA^d, IA^da, un linker, une glissière à leucine acide, un linker, une région

25 Hinge, la région CH₂, puis la région CH₃ de Fc.

Cette construction est insérée dans le plasmide représenté sur la figure 2 et placée pour le contrôle d'un promoteur de métallothionéine inductible par CuSO₄.

30 . Construction de l'ADNc codant pour la protéine recombinante LACK/I-A β^d/glissière à leucine (clone 268) et insertion dans un plasmide Cette construction est illustrée par la figure 3, qui donne la séquence d'ADNc, de la position 420 à 1370, et celle du peptide codé (440-1359) (SEQ ID N° 2)

L'ADNc comprend successivement les fragments, ligués entre eux, : codant pour une séquence leader, β1, un peptide LACK (158-73), un linker, un site thrombine, un linker, IAβ^d (β1)

Cette construction est insérée dans le plasmide représenté sur la figure 4, et détaillé sur la figure 5.

 $IA\beta^{d}$ (β_{2}) , un linker, une glissière à leucine basique, un

- 2. Transfection des plasmides dans des cellules de Drosophile
 - 3. Sélection des transmettants stables
 Les étapes 2 et 3 sont réalisées en opérant selon (6).
 - 4. Production et purification des complexes

20 A) Production

15

25

marqueur à motifs histidine.

On met en culture les cellules transfectées de Drosophile dans des flacons de 3 l, à 24°C, dans un milieu SFM Drosophile (GIBCO-BRL), supplémenté avec 1% de SVF (sérum de veau foetal).

Lorsque la densité cellulaire atteint 5×10^6 cellules/ml, on induit la production de molécules LACK/IAd en ajoutant CuSO₄ à la concentration finale de 1 mM, puis on soumet le milieu à incubation durant 5 à 6 jours.

On recueille les surnageants et, par centrifugation, on élimine les débris cellulaires (20 min, 10K, 4°C). Les surnageants sont ensuite transférés dans des tubes et à nouveau centrifugés.

On concentre les surnageants 8 à 10 fois en utilisant un concentrateur Prepscale^R (Millipore, Inc.) On congèle à -70°C jusqu'à l'obtention de 500 ml de surnageants concentrés.

10 B) Purification

25

30

On décongèle les surnageants à 37°C. On centrifuge 15 min à 10K. Les surnageants sont ensuite transférés dans de nouveaux tubes et à nouveau centrifugés 15 min à 10 K.

On les charge alors sur une colonne d'immunoaffinité MK-D6 (volume de lit 5 ml), équilibrée au préalable dans un tampon A de 20 mM de phosphate de sodium pH 7,0. La vitesse d'élution est de 10 à 20 ml/h.

La colonne est lavée avec 30 ml de tampon A (6 fois le volume de lit) à 0,5 ml/min.

20 Pour l'élution, on utilise 15 ml de CAPS 50 mM pH 11,5 en opérant par gravidité.

On recueille 15 fractions de 1 ml chacune.

Chaque fraction est neutralisée avec 300 μ l de phosphate de sodium (200 mM, pH 6,2). On ajoute immédiatement des inhibiteurs de protéase (Complete^R, Roche Diagnostics) dans chaque échantillon.

On neutralise la colonne avec le tampon A.

Pour éviter l'aggrégation des molécules de peptide/CMH, on effectue immédiatement une chromatographie par échange d'ions après l'élution.

On détermine la concentration protéique de chaque fraction par électrophorèse en gel dénaturant.

Les fractions positives sont rassemblées et chargées sur colonne échangeuse d'ions (Mono Q) (Pharmacia Biotech).

On utilise un tampon B : Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 et un tampon C : Tris-HCl 20 mM pH 8,0 + 1M NaCl.

On opère selon les gradients suivants :

10

0-5 min : 0% C; 5-20 min : 0-50% C ; 20-21 min : 50-100% C ; 21-25 min : 100% C ; 25-26 min : 100% C ; 26-30 min : 0%C.

Les molécules LACK/IA^d éluent généralement à 30-15 36% en tampon C. On recueille les fractions correspondant au pic d'élution et on détermine la concentration protéique par électrophorèse en gel dénaturant.

Les fractions positives sont rassemblées et dialysées à 4°C contre 2 l de PBS, pH 7,4.

On change le tampon de dialyse 2 fois en 24 h. La concentration en protéines est déterminée selon le test BCA (Biorad). Les échantillons sont congelés à -70°C en petites fractions (8 μ g). Les rendements sont de l'ordre de 0,5 mg/l de surnageant cellulaire.

25 C. Production de complexes multivalents (figure 6)

On prépare une solution de protéine A-couplée à un fluorophore constitué par Alexa 488^R (sondes moléculaires # P-11047) à une concentration de 0,5 mg/ml dans PBS 1 X, pH 7,4. (Protéine A de Sigma)

30 Des aliquotes de 100 μ l sont préparés et congelés à -20°C.

Un aliquote de molécule peptide/CMH (8 μ g) est décongelé et on ajoute 1,1 μ l de protéine A couplée au fluorophore Alexa. On soumet le mélange à incubation à température ambiante pendant 30 min, puis on ajoute un mélange PBS/ASB (albumine de sérum bovin) 0,1 % pour un volume final de 50 μ l. On ajoute 1 μ l de sérum de souris et on utilise directement le produit comme réactif de coloration.

D- Cytoflurométrie de flux

On purifie des cellules T à partir des ganglions 15 lymphatiques d'une souris. On transfère 10⁶ cellules dans un tube et on ajoute le réactif de coloration. Deux heures plus tard, les cellules sont lavées en tampon isotonique et analysées en cytofluorométrie de flux. La fréquence des cellules réagissant avec le réactif de coloration est déterminée par cette méthode.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1/ Altman et al, Science, volume 274, 4 octobre 1996.
 - 2/ Scott et al, J. Exp. Med. 183:2087-2095, 1996.
- 25 3/ Kalandadze et al, J Biol Chem. 271 (33) : 20156-62, 1996.
 - 4/ Kozono et al, Nature. 369 : 151-153, 1994.
 - 5/ Kozono et al, Immunity. 3: 187-196, 1995.

6/ Sambrook et al, Molecular Cloning : second Edition (1989).

7/ Ausubel et al, Current Protocols in Molecular Biology, Ed John Wiley and Sons, Inc., 1997.

5

10

25

30

REVENDICATIONS

- 1/ Protéines recombinantes solubles, constituées au minimum d'un dimère lui-même formé des chaînes α et β des molécules du CMH de classe I ou II, caractérisées en ce qu'elles comportent à l'extrémité carboxy-terminale de l'une ou des 2 chaînes, tout ou partie d'une région Fc d'une immunoglobuline.
- 2/ Protéines recombinantes solubles selon la revendication 1, caractérisées en ce qu'elles comportent tout ou partie des chaînes α ou β des molécules du CMH.
- 3/ Protéines recombinantes solubles selon la revendication 1 ou 2, caractérisées en ce qu'elles comportent tout ou partie du domaine CH₂ et/ou CH₃ de la région Fc.
- 4/ Protéines recombinantes solubles selon l'une 20 quelconque des revendications 1 à 3, caractérisées en ce que les chaînes qui constituent le dimère comportent des glissières à leucine.
 - 5/ Protéines recombinantes solubles selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisées en ce qu'elles sont associées en plusieurs dimères et notamment en tétramères ou en octamères.
 - 6/ Protéines recombinantes solubles selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisées en ce qu'elles sont complexées à des protéines naturelles ou artificielles, comportant plusieurs sites de liaison pour

- 5 les régions constantes des immunoglobulines, telles que la protéine A, la protéine G, ou des multimères de récepteur des régions Fc obtenus par recombinaison génétique.
- 7/ Protéines recombinantes solubles selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisées en ce 10 qu'elles sont liées de manière covalente ou non covalente à un peptide antigénique.
 - 8/ Protéines recombinantes solubles selon la revendication 7, caractérisées en ce que le peptide antigénique est fixé à l'extrémité amino-terminale de la chaîne β par l'intermédiaire d'un bras flexible.

15

30

- 9/ Séquences nucléotidiques possédant un cadre de lecture correspondant à tout ou partie d'une molécule selon l'une quelconque des revendications 1 à 8.
- 10/ Vecteurs d'expression, notamment plasmides, 20 caractérisés en ce qu'ils comportent une séquence selon la revendication 9.
 - 11/ Cellules procaryotes ou eucaryotes porteuses d'au moins un vecteur selon la revendication 10.
- 12/ Utilisation des molécules selon la 25 revendication 7 ou 8, pour dénombrer et/ou purifier les lymphocytes T réagissant avec un antigène donné et pour caractériser le phénotype de ces cellules.
 - 13/ Utilisation selon la revendication 12, comme molécules immunostimulantes, notamment pour le développement de vaccins.

- 14/ Utilisation selon la revendication 12, comme moyen prédictif de l'état d'un patient pour dénombrer et déterminer le phénotype de cellules T autoréactives chez des malades à risques, ou à des fins thérapeutiques.
- 15/ Utilisation des molécules selon la revendication 10 ou 8, pour la purification l'enrichissement de lymphocytes T spécifiques d'un antigène donné, soit à partir de cultures cellulaires, soit à partir de prélèvements sur un patient.
- 16/ Utilisation selon la revendication 15,
 15 caractérisé en ce que les populations de lymphocytes T
 enrichies en un type de cellules T donné sont utilisées à
 des fins de thérapie cellulaire.

LISTE DE SEQUENCES

<110> C. N. R. S.

<120> "Protéines recombinantes, et complexes moléculaires dérivés de ces protéines, analogues à des molécules impliquées dans les réponses immunitaires".

<130> CP/VB 973

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1484

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1482)

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: ligation de fragments d'ADNc

<400> 1

atg ccg tgc agc aga gct ctg att ctg ggg gtc ctc gcc ctg aac acc 48 Met Pro Cys Ser Arg Ala Leu Ile Leu Gly Val Leu Ala Leu Asn Thr

atg ctc agc ctc tgc gga ggt gaa gac gac att gag gcc gac cac gta 96 Met Leu Ser Leu Cys Gly Gly Glu Asp Asp Ile Glu Ala Asp His Val 20 25 30

ggc ttc tat ggt aca act gtt tat cag tct cct gga gac att ggc cag 144 Gly Phe Tyr Gly Thr Thr Val Tyr Gln Ser Pro Gly Asp Ile Gly Gln

tac aca cat gaa ttt gat ggt gat gag ttg ttc tat gtg gac ttg gat 192
Tyr Thr His Glu Phe Asp Gly Asp Glu Leu Phe Tyr Val Asp Leu Asp
50 55 60

aag aag aaa act gtc tgg agg ctt cct gag ttt ggc caa ttg ata ctc
Lys Lys Lys Thr Val Trp Arg Leu Pro Glu Phe Gly Gln Leu Ile Leu
65 70 75 80

ttt gag ccc caa ggt gga ctg caa aac ata gct gca gaa aaa cac aac 288
Phe Glu Pro Gln Gly Gly Leu Gln Asn Ile Ala Ala Glu Lys His Asn
90 95

ttg gga atc ttg act aag agg tca aat ttc acc cca gct acc aat gag
Leu Gly Ile Leu Thr Lys Arg Ser Asn Phe Thr Pro Ala Thr Asn Glu
100 105 110

gct cct caa gcg act gtg ttc ccc aag tcc cct gtg ctg ctg ggt cag 384
Ala Pro Gln Ala Thr Val Phe Pro Lys Ser Pro Val Leu Leu Gly Gln
115 120 125

ccc aac acc ctt atc tgc ttt gtg gac aac atc ttc cca cct gtg atc 432
Pro Asn Thr Leu Ile Cys Phe Val Asp Asn Ile Phe Pro Pro Val Ile

140

130 135

aac Asn 145	atc Ile	aca Thr	tgg Trp	ctc Leu	aga Arg 150	aat Asn	agc Ser	aag Lys	tca Ser	gtc Val 155	aca Thr	gac Asp	ggc Gly	gtt Val	tat Tyr 160	480
													aag Lys			528
tat Tyr	ctc Leu	acc Thr	ttc Phe 180	atc Ile	cct Pro	tct Ser	gat Asp	gat Asp 185	gac Asp	att Ile	tat Tyr	gac Asp	tgc Cys 190	aag Lys	gtg Val	576
gag Glu	cac His	tgg Trp 195	ggc Gly	ctg Leu	gag Glu	gag Glu	ccg Pro 200	gtt Val	ctg Leu	aaa Lys	cac His	tgg Trp 205	gaa Glu	cct Pro	gag Glu	624
att Ile	cca Pro 210	gcc Ala	ccc Pro	atg Met	tca Ser	gag Glu 215	ctg Leu	aca Thr	gaa Glu	act Thr	gga Gly 220	ggt Gly	gga Gly	gga Gly	tcc Ser	672
act Thr 225	aca Thr	gct Ala	cca Pro	tca Ser	gct Ala 230	cag Gln	ctc Leu	gaa Glu	aaa Lys	gag Glu 235	ctc Leu	cag Gln	gcc Ala	ctg Leu	gag Glu 240	720
aag Lys	gaa Glu	aat Asn	gca Ala	cag Gln 245	ctg Leu	gaa Glu	tgg Trp	gag Glu	ttg Leu 250	caa Gln	gca Ala	ctg Leu	gaa Glu	aag Lys 255	gaa Glu	768
ctg Leu	gct Ala	cag Gln	gca Ala 260	gca Ala	tct Ser	gag Glu	ccc Pro	aga Arg 265	GJ À aaa	ccc Pro	aca Thr	atc Ile	aag Lys 270	ccc Pro	tgt Cys	816
cct Pro	cca Pro	tgc Cys 275	aaa Lys	tgc Cys	cca Pro	gca Ala	cct Pro 280	aac Asn	ctc Leu	ttg Leu	ggt Gly	gga Gly 285	cca Pro	tcc Ser	gtc Val	864
ttc Phe	atc Ile 290	ttc Phe	cct Pro	cca Pro	aag Lys	atc Ile 295	aag Lys	gat Asp	gta Val	ctc Leu	atg Met 300	atc Ile	tcc Ser	ctg Leu	agc Ser	912
ccc Pro 305	ata Ile	gtc Val	aca Thr	tgt Cys	gtg Val 310	gtg Val	gtg Val	gat Asp	gtg Val	agc Ser 315	gag Glu	gat Asp	gac Asp	cca Pro	gat Asp 320	960
gtc Val	cag Gln	atc Ile	agc Ser	tgg Trp 325	ttt Phe	gtg Val	aac Asn	aac Asn	gtg Val 330	gaa Glu	gta Val	cac His	aca Thr	gct Ala 335	cag Gln	1008
aca Thr	caa Gln	acc Thr	cat His 340	aga Arg	gag Glu	gat Asp	tac Tyr	aac Asn 345	agt Ser	act Thr	ctc Leu	cgg Arg	gtg Val 350	gtc Val	agt Ser	1056
gcc Ala	ctc Leu	ccc Pro 355	atc Ile	cag Gln	cac His	cag Gln	gac Asp 360	tgg Trp	atg Met	agt Ser	ggc Gly	aag Lys 365	gag Glu	ttc Phe	aaa Lys	1104
tgc Cys	aag Lys 370	gtc Val	aac Asn	aac Asn	aaa Lys	gac Asp 375	ctc Leu	cca Pro	gcg Ala	ccc Pro	atc Ile 380	gag Glu	aga Arg	acc Thr	atc Ile	1152
tca Ser 385	aaa Lys	ccc Pro	aaa Lys	Gly	tca Ser 390	gta Val	aga Arg	gct Ala	cca Pro	cag Gln 395	gta Val	tat Tyr	gtc Val	ttg Leu	cct Pro 400	1200

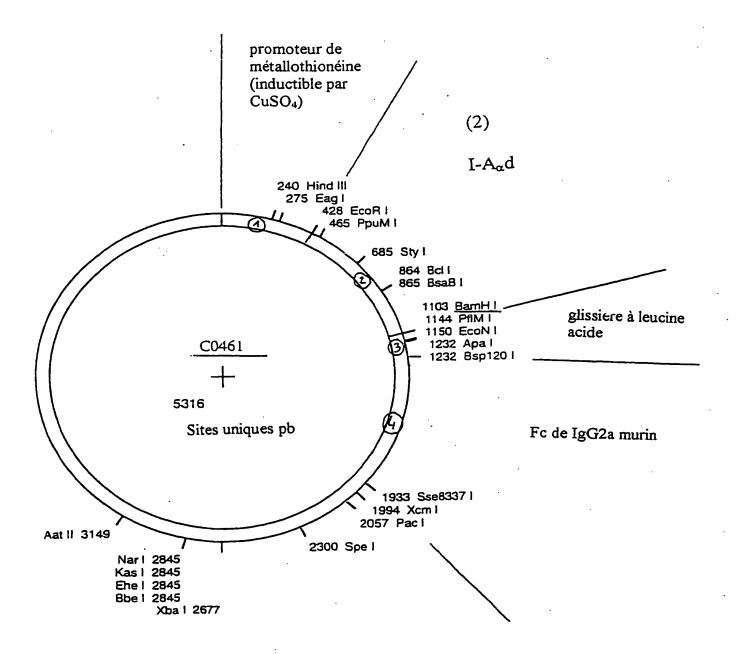
							,									
			gaa Glu													1248
gtc Val	aca Thr	gac Asp	ttc Phe 420	atg Met	cct Pro	gaa Glu	gac Asp	att Ile 425	tac Tyr	gtg Val	gag Glu	tgg Trp	acc Thr 430	aac Asn	aac Asn	1296
			gag Glu													1344
			tac Tyr													1392
			aga Arg													1440
			cac His											aa		1484
<212 <213 <220 <223 <220 <221	1> 92 2> AI 3> Sé 0> 0> de	ON Equer Escri Es fra	nce a lptic lgmer (921)	on de	e la	séqu	ience	e art	cific	ciel]	.e: Li	igati	Lon			
atg			cag Gln													48
ctg Leu	atg Met	gtg Val	ctg Leu 20	agc Ser	agc Ser	ccc Pro	G1y ggg	act Thr 25	gag Glu	ggc Gly	gga Gly	aac Asn	tcc Ser 30	atc Ile	tgc Cys	96
			tcg Ser													144
			~~~	tca	cta	ata	ccc	cqa					gga			192
			Gly						Gly	Ser	Gly 60	Gly	Gly	Gly	Ser	132
Gly	Gly 50 agg	Gly		Ser gtg	Leu gtc	Val 55 cag	Pro ttc	Arg	ggc	gag	60 tgc	tac	tac	acc	aac	240
gaa Glu 65	Gly 50 agg Arg	Gly cat His	Gly	Ser gtg Val ata	gtc Val 70	Val 55 cag Gln	Pro ttc Phe gtg	Arg aag Lys acc	ggc Gly aga	gag Glu 75 tac	60 tgc Cys	tac Tyr	tac Tyr	acc Thr	aac Asn 80 gag	
gaa Glu 65 ggg Gly	Gly 50 agg Arg acg Thr	Gly cat His cag Gln	Gly ttc Phe cgc Arg	Ser gtg Val ata Ile 85	gtc Val 70 cgg Arg	Val 55 cag Gln ctc Leu	Pro ttc Phe gtg Val	aag Lys acc Thr	ggc Gly aga Arg 90	gag Glu 75 tac Tyr	60 tgc Cys atc Ile	tac Tyr tac Tyr	tac Tyr aac Asn	acc Thr cgg Arg 95	aac Asn 80 gag Glu acc	240
 gaa Glu 65 ggg Gly	Gly 50 agg Arg acg Thr	Gly cat His cag Gln	Gly ttc Phe cgc Arg	Ser gtg Val ata Ile 85	gtc Val 70 cgg Arg	Val 55 cag Gln ctc Leu	Pro ttc Phe gtg Val	aag Lys acc Thr	ggc Gly aga Arg 90	gag Glu 75 tac Tyr	60 tgc Cys atc Ile	tac Tyr tac Tyr	tac Tyr aac Asn	acc Thr cgg Arg 95	aac Asn 80 gag Glu acc	240

100 105

	ctg Leu									384
	gag Glu 130									432
	Gly					Arg				480
_	gcc Ala		_			_				528
	gtc Val									576
	ttc Phe									624
	att Ile 210									672
	acc Thr									720
	ctg Leu									768
	cgg Arg									816
	aaa Lys									864
	aaa Lys 290									912
cat His 305	cat His	tga								921

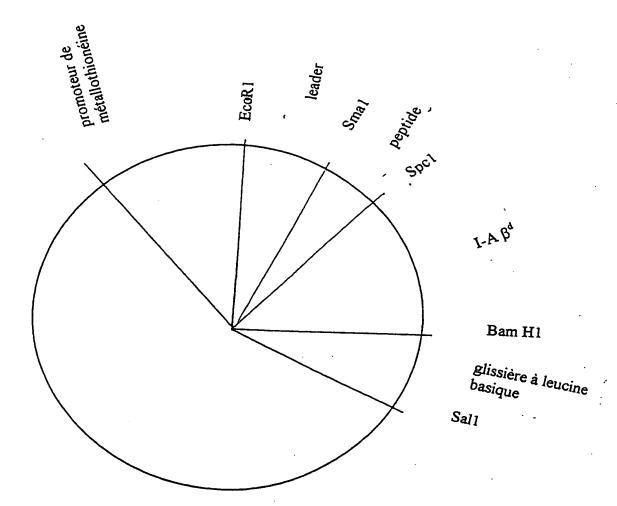
		•												• •					••				No Sal I Site
		<b></b>	<u>.</u>							^	,												sal I
	F GGT ACA A CCA TGT GIY The	O C ATA C TAT	<u> </u>	C AAG G TTC		C ACC	1050	20 ACC 20		G CTG GAA		7. T.	ž	<b>Y</b> 55	3	GTC AAC AAC CAG TTG TTG	g R	· \$ \$	-	7 E	•	TOALTCGACCTG	9
	6 C A	670 	<u>ب</u> =	TITC CCC	920	GAG ACC CTC TGG		ર્ડ કે ≅		CCTC	1300	CAG	5	AAC GTG	5	TC AAC	-	, 0,55 1,56 1,57		A. A. G.	 		
9	. ₹ £ ₹	. 55	ნ ⊁ ფ			655 554		G AAA C 1777		ែជិចច		7 7CC 7 AGG	ž   _	110	₹ = =	533		GIC ACT CTG	<u> </u>	ATR TSC 55C ATG 80C T21	-	. 10 ×	
•	Phe AAG	995 ¥	ر ال		! :	CAA ATA	1040	CAN GAC		T CCA A CCT		2		. X	Ĉ.	TOC AAG ACU TYC CYS LYS	1670	. Çêş	•			- 经数:	7
	. 888	660 KG TT	ž. 2	SG ACT	016	558	. ~	C CAN		4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4	1290	• g 5 g	3	TIT GIG AAA CAC		 	. =	503		TOT TAX TITE ANA ATO ANG Ser Tya Pin-	1420		
2	S KAT	# . F. # # # # # # # # # # # # # # # # #	<u>.</u>	500 F	-	GAC GOC CTG CCG	•	GAG CCG CTC GGC Glu Pro	1160	მ <b>შმ.</b> ფსდ	용	3 5 5 3 4 5 5 5	3	145		C AAA G TTT	•	ANA CAG O	1700	. 18.	• -	75 S	
	2 5 5 5 1 1 1 2 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5	- 55 <b>}</b> ‡		CCT CAA GGA GITI		ACA 6.		CHC CI	_	£45 ⊑20.	, SC	563	1410	ACC THE TCG ACC	:	CTC AAG			<u>-</u>	548		. 26.	
	GAC ATT GAG GCC GAC CAC GTA GGC TTC CTG TAA CTC CGG CTG GTG CAT CCG AAG AAS I I I G GLU A I A ASP HIS AAN AT A TAA	TTG GAT AND AND AND ACT OF TOD AGG CTT CCT GAG TTT AND CTT TTG CTG GAG CTT CCT GAG TTT AND CTG TTG CTG GAG GAG CTG CAAA GAG CTG CAAA GAG CTG CAAA GAG CTG CAAA GAGA CTG CAAAA CAAAA CTG CAAAA CTG CAAA GAGA CTG CAAAA CAAAA CTG CAAAA CAAAA CTG CAAAA CAAAA CTG CAAAA CAAAAA CTG CAAAA CAAAAA CTG CAAAAAA CTG CAAAAAAA CTG CAAAAAAAA CTG CAAAAAAAAAA	5 7	. ₽ 6 5 5 6 7 •	۰	4 E E	1030	2 y 3			ize 12.80	CCA GCA CCT AAC CTC TTG GUT GGA CCA GCT CGT GGA TTG GAG AAC CCA CCT GGT	1	. 75 £ 5 2 7 €		555 925	1,660	ATC ACT ANG TAC TOA TIC	<del>.</del> :	CAT GGT CTA CCA AND GLY	1910	CGC ACT GCC TGA A19 Thi	
_	\$8₹	. 25	٠ <u>د</u>	AAT GAG GCT	900	755		CCG CAC	20	. 584 707	್ದ ಶ	.553		35 5 5 5 5	15.10	מכב אאם ככם דדכ מוץ ניץ	•	ATC ACTAC	: 5	35% * 5%*		. 98 <del>1</del>	
53	5 5 5	540	יאי די עני	7. 7. 7. 7. 7. 7. 7. 7. 7. 7. 7. 7. 7. 7		. 647.	. 2	. 200	1150	8 2 5 5 1 5 6 6	ère	2 C 2	3	564		: 555 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5			1780	2		TTC TCC AAG AGG	
	. \$ \$ I	660 1040 1040	E .	- 55 F		AGC 1	1020	CAC 1 GTC 1		, 5, 5, 6, 6, 6, 6, 6, 6, 6, 6, 6, 6, 6, 6, 6,	dissi Section	. 25	1	. 75.75 2.75.05 2.75.05	_	7.75	0591	4 T 3		255 255	1500	25 E = 25 E =	Ì
	. 756	. { E	 	CGA TGG	890	CTC AGA AAT AGE AAG 1CA GTC GAG TCT TTA TCG TTC AGT CAG Leu Arg Asn Sei Lys Ser Val		GAG CAC TGG CTC GTG ACC Glu His Trp	1140	ປ່ຽວ		5000	:	CCA CAT GTC CAG ATT GGT CTA CAG GTC TAG FTO ASP VAT GTD TER	1520	TUG ATU AGT		SAS S	F.	. XS		ACT AND ADE TOATT C TCC The Lys Ser	J 7
910	\$ E E	AAG TTC	יין אַלין	CCA CCT Pro		• AGA 177.	9	AAG GTG C TTC CAC C Lys Val G	=	CAT TTT CIT TTT Glu Lys		¥£1,	:   §	C'TG GA	•	CHC CHC	•	. 664 . 664	きこり	¥25		ion y roa <b>d</b> rin Ly	•
_	AGC CTC TGC GGA GGT GAA GAC TCG GAG ACG CCT CCA CTT CTG Ser Leu Cys Gly Gly Asp	<del>2</del> × F	. <del>,</del> 2	TTC ACC CCA I		5 5 5 T	1010	AAG Tic Lys	•	. 45°	1260	CCA TCC CCT ACG	;	GAG GAT CTC CTA Glu ASP	•	CAG GAC GTC GTC GTC ASP	1640	T CCA CCA GAA GAA GAG A A GGT GGT CTT CTT CTC 1		ANY ACT GAA 1'CA GW' CTG GAC 1'C'T TTO TGA CTT LGT CAL GAL CTG AGA ASD THE GLE PEO VOL LOE ASP GG.	1800	. 5 5 E	
	. 50 c	85	4	TTC AAG	880	100 P		CAC TGC CTG ACG Asp Cys	8.	. 583 183	-	5 5 S		0.00 0.00 0.00 0.00	1510	CAC GTG		TTG CCT AAC GGA	l g	· \$5 £	7	555 113 114	
20	75C 87S 67S	T O	, 5	TCA AAT 1 AGT TTA 1		ACA 10 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	۰	A C C C	1130	25 6		. CC.	1 2	. Acc		. 355	_	71 74 16u	1760	74.	,	CAT ANT CAT CAC ACC GTG TTA GTG GTG TGC His Asn His His Thu	
	· 583	GTG GAC .	-	S A C		AAC ATC TTG TAG Asn 11e	1000	ATT TAT TAA ATA	. •	. 5 5 4 - 7 5 5 4	1250	. 503	. –	ZČŽ ZVZ		C ATC D TAG	1630	. 5 S s		TAC AAG	0881	- 74. 1	
	A 5 5 5	553 553	? :	NG AGG	870	ATC AA TAG TT		GAT GAT GAC ATT	٠.	A GCT CCA TCA GCT CAG CTC GAT T CGA GGT AGT CGA GTC GAG CT A A B GIA Leu G	=	G CCC ACA ATC ANG CCC TUT CCT CC C GGG TGT TAG TTC GGG ACA GGA GGA Y Fro Thr 11e Lys Pto Cys Pro Pr	NCE.	1 GTG GTG GAT GTG AGC G C CAC CTA CAC TCG C I VAI 'VAI ASP VAI SEF G	1500	CTC CCC GAG GGG Leu Pro		. ¥£± • ¥₹¥				35.5	
490	ACC ATG CTC ATG TAC GAG T	TTC TAT	. 6	ACT AAG TGA TTC Thr Lys		676 A1 CAC 21		\$36 £≩≱.	1120	554		585 513	352	253.		5 GAG	-	203 238.	138	GAG CTA AAC TTC GAT TTG Glu Len Agn	•	Orat Cris CCA OAC Cly Letu	
	ATC TAC	77G 7	- 5			256	066	7. ¥. €	•	A0A 101 Tot 00	ş.	= 45°. = 45°.	régio	TOT GIVE GIVE ACA CAC CAC Cys - al val		AGT GCC TCA CGG Ser Als	1620	555°		.531 .231	٠.5	cac orn crc cra car cra car cra	
	ָאָלָבָּי (	35.		ATC TTG TAG AAC 11e Leu	960	CCA CUT GGT GGA Fro Pro	•	. 75. 6 88. 8	٠.	<b>ភ្</b> គ្គ	1240	1866 1867 1867	;	TOT CHO ACA CAC Cys · al	1490	GTC A CAG T		1984 1980 1980	ے ا	75. 6 76. 6	ie74	CAC C.	
480	ic AA .	GAT SAS TTG 1	קר פני	. 825		AAG Pie	99 '	. 5 8 2		भूष्ट्र हैं	-	8 5 2	1 9	֓֞֞֞֞֜֞֓֓֓֓֓֓֓֓֓֓֓֓֓֓֓֓֓֓֓֓֡֓֡֓֓֡֓֡֓֡֓֡֓		C 24.5 CAC 0		. SES	0.7	444 1117 172	•	CAC C	
	GPC CTC CCC CTG AAC A CAG GAG CGG GAC TTG T	CAT GGT	;	AAC TTG TTG AAC ASH LEU		77C 77G	86	ACC TTC ATC CCT TG AND TAG GGA The Pie 11e Pro	BamHI.1	1 CCA CCT CCT AGG TCC	, S	CT GAG CCC AGA C	-	ATA CTC ACA TAT CAG TGT		CCG CNC CCC CNC Arg Val	1610	S C S	•	0.00 0.00 0.17	1860	CAC	
_	5 5 4 J	CTA	•	AAC TTG ASH	850	AAC TTG	•	AAG Plie	e .	ફ ਹੈ ਫ਼ੇ		00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00		ATA TAT 11e	1480	CTC GAC	•	AGT AGT	g.	7 1 A A C	=	75. AG 7. Ser a	
<b>6</b>	. D 54.	. TT	8	AAA CAC TTF GTG Lys His		A SP		705 705 74T	1100	6 5 g	Ĭ.	955	13	258.5		P A F		£ 38	Ę.	AAC Tro	•	<u>इ</u> ड्डॅ	
	. 20 2	2 · 3 · 3		¥£3		CAC	970	500		853	<u> </u>	AGA Ser		35 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 3 5 7 5 7		AGF TCA	1600	AF 3	<b>~</b> .	754 125 114	05.	300	
	5 5 4 <u>1</u>	<b>₹</b> 5		4 5 6	840	. F. § §	•	T	۵.	Pot i	=	954	Linke	583	1470	C AAC G 1770 F Asr	•	885	٥.	10 A C T T T T T T T T T T T T T T T T T T	1850	37. 0 27. 0	
460	TA TA Sign	. 5 5 E	26	₹ 00 € 1 € 2 € 5		\$ \$ \$ \$ \$		7. 7. a	1090	979	-	885	_₹.	က်ရှိန ကိုရှိနှ		444		4 ± 3	1720	855 84-	•	F 4 6	
	5 2 3 3	5 4 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5	<del>7</del> :	14 CG 14 C		# <b># # #</b> # # # # # # # # # # # # # # #	960	2027	•	571 55E	١.	555	—— i	252		353	1590	753	•	50% 92%	٠ و	4 F 2	
	25 5 4 5 E	. 300 300 300 300 300	•	AC A TO T	830	202	•	75 t	٠.	553	6121	50 A	İ	7.0 X	1460	55.5	. <b>•</b>	¥ £ ٦ ئ ئۇ. ئ	٥.	F 4 4	1840	7 F Z	
450	0 7 7	TAA C	200	. AF		100 m		77 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5	1080	0 L0	•	740	۱۶.	7 TA C		TA A		100 A	1710	7. 01. 1. 0. 1.	•	3 1 e	
	00 = 1 ×	O CTO	•	oyc CTG CTG		ម្តី ខ្លួ	056	1 5 5 7 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	•	AC A	٥.	200	<del>-</del>	14 C		2025	1580	אם אם אני רי אוני	•	4 F.3	۵.		
	265	, 450 y		CCT	820	510 510 510		TAT 1	•	2000	1200	Y La		7 S Y	1450	AA C		A7C TAG 11e	٠.	7 S S S S S S S S S S S S S S S S S S S	1830	MAC 17G Y	
€.	555	. F. 80 5	069	0 0 d		CCA 201		Asp I	1070	ပ္ပစ္တန္	•	0.4C	g.	77C 7	<u> </u>	25 to 15 to		200 cr	001	TAC	•	T C C	
	8 th # 1 8	. 1CT	•	CAA GIA		CAC C46	940.	CGT	•	700 Pro 8	٠.	CGT	9261	A E Y		010 010	1570	CTC CCA GCO CCC ATC GAG AGC ATC TCA AAA CUC AAA GGG TCA GTA AGA HCT CCA CAG GTA TAT GTC GAG GGT TGG CTC TCT TGG TAG AGT TTT GGG TAT CCC AGT TCT CGA GGT GTC CAT ATA CAG LAU FFO ALA FFO TGG GGT GTC CAT ATA CAG LAU FFO ALA FFO ATG TGT GGG GGT GTC ATA TAG CAG FFO ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG TAT ATG TAG TA	•	CAC TYC AYG CCT DAA GAC ATT TAC GTG GAG TGG ACC AAC AAC GGG CTG AAG TAC CTG TAA ATG CAC CTG AC' TGG TYG TYG CCC AGI PIP HAT FIO GIU ASP IIA TYY YAI GIU TIP THY ASN AAN GIY	٠.	AGA 17D GAA AAG AAC TGG GTG GAA AGA AAT AGC TAC TCC TGT TCA TCT CAC CTT TCT TTA TCG ATG AGGACA AGT ATG VAI GIU LYA LYA ASA TST VAI GIU LYA LYA ASA TST VAI GIU LAA SAC TYE TG ATG GIU ALG AAG SAC TYE SEE GASGACA AGT	
٠.	STATE OF THE STATE	25 25 61 61 61		- ၁၁ ဗိုင္	910	5 7 3 3 2 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3		AAC Aan		TAA TAA 11e	1190	CAA GTT	•	CC 4		CGA CGA Ala		565		5 5 g	1820	§E3	
430		• 474 7.77	089	. 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5	_	CAC CAC		040 CAG V&1	1060	CTC GF4	•	AAC Leu	٥.	100 S	1440	ACA Tat		£83	, 9641	A PET	•	5 5 7 5 7 7 8	
•	AAAGGGGGAATTCAGG ATG CCG TGC AGA GCT CTG ATT CTG GGG TTTCCCCCCTFAAGTCC TAC GGC ACG TCG TCT CGA GAC TAA GAC CCC EGORI HEE PEO Cys Ser Arg Als Leu 11e Leu Gly 550 560 470 AS	ACT GTT TAT CAN TET CIT COA DAC ATT GGE CAG TAC ACA CAT GAS TITT TGA CAA ATA GTE ADA GGA CET CTO TAA CGG GTE ATO TOT GTA CTT AAA THE VAI TYF GIN SAF PIO GIY ASD 118 GIN GIN TAY THE WIS GIN PAA	•	CTC TTT GAG CCC CAA GGT GGA CTG CAA AAC ATA GCT GCA GAA AAA GAG AAA CTC GAG GTT CCA CCT GAC GTT TTG TAT CGA CGT CTT TTT LEU Phe Glu Pro Gln Gly Gly Leu Gln Asn Ile Ala Ala Glu Lys	•	TCC CCT GTG CTG CGT CAU CCC AAC ACC CTT ATC TGC TTT AGG GGA CAC GAC GAC CCA GTC GGG TTG TGG GAA TAG ACG AAA Ser Pro Val Leu Leu Gly Gin Pro Aen Thr Leu ile Cys Phe	930	TTC CTC GTC AAC CGT GAU CAT TCC TTC CAU AAG CTU TCT TAT CTC AAG GAG CAG TTG GCA CTG GTA AGG AAG GTG TTC GAC AGA ATA GAG IIIe Leu Val Asn Asg Asp IIIs Ser Phe His Lys Leu Ser Tyr Leu		GAA CCT GAG ATT CCA GCC CCC ATG TCA GAG CTO ACA GAA ACT GGA CTT GGA CTC TAA GGT CGG GGG TAC AGT CTC GAC TGT CTT TGA CCT GIU Pro GIU ILE Pro Ala Pro Het Ser GIU Leu Thr Glu Thr Gly		TOG GAG TTG CAA GCA CTG GAA AAG GAA CTG GCT CAG GCA GCT TCT ACC CTC AAC GTT CGT GAC CTT TTC CTT GAC CGA GTC CGT AGA TTP GTU Leu Ale GIN Ale Leu GIN LAE GTU Leu Ale GIN Ale SEC	1.	ATC TTC CCT CCA ANG ATC ANG GAT GTA CTC ATG ATC TCC CTG AGC CCC TAG AAG GGA GGT TTC TAG TTC CTA CAT GAG TAC TAG AGG GAC TCG GAG LILB PHP PRO PIO LYS 116 LYS ASP VAI LEU HET 116 SEF LEU SEF PRO CHI.		GTA CAC ACA GCT CAG ACA CAA ACC CAT AGA GAG GAT TAC AAC AGT ACT CAT GTG TGT GTG TTG GTA TÇT CTC CTA ATG TTG TCA TGA VAI His Thr Ala Gla Thr Gla Thr His Arg Gla Asp Tyr Asa Ser Thr	1560	25 5	•	ATG GTC ACA C TAC CAG TRIT C Mer Val This		CTG AGA (TU GAC TCT GAC Leu Arg Val	
420 •	<b>₹</b> %	å 5 t	•	CTC CAG	800	AGG		AAG Sie		853	1180	ACC ACC	•	TAC -	6.0	GTA CAT Val	-	TIT EV		ארר ארר	<u>.</u>		1940

FIGURE 2

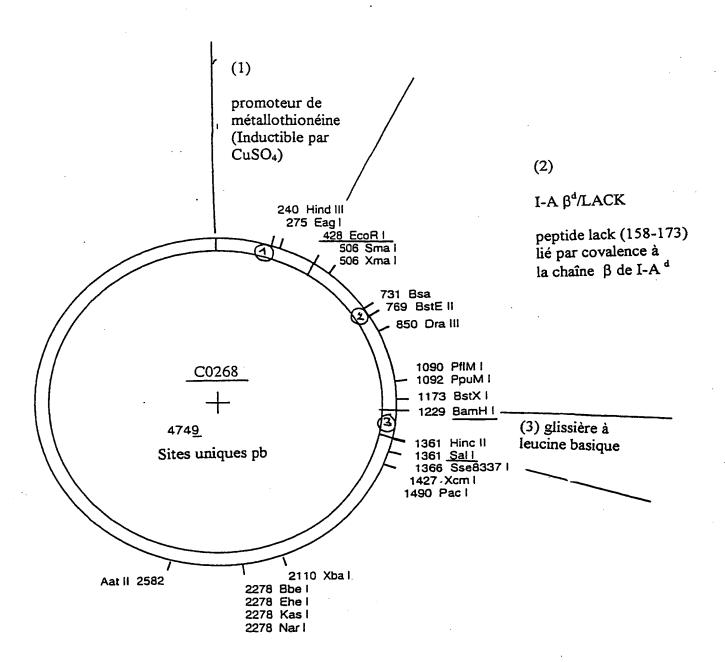


					nbine												· ==					
		ACT Thr>		TG al>	690 Ste Thrombine	ATA Ile>	ı	GGC G1y>		GAG G1u>		AC ISB	•	TCA Ser>		Cys,	Bam H1	TCC Ser >	Ŧ	AAG Lys>	1	
G ma 1	510	AGC CCC GGG Ser Pro Gly	009	TCA CTA GTG Ser Leu Val>	¥ 069	TAC TAC ACC AAC GGG ACG CAG CGC ATA Tyr Tyr Thr Asn Gly Thr Gln Arg Ile	. O87		870		. 096	CTG TCC AGG ACA GAG GCC CTC AAC CAC CAC AAC Leu Ser Arg Thr Glu Ala Leu Asn His His Asn>	1050	GGG GTC 1 Gly Val 9	1140		1230	A GGA 1	er 1320	CTC		
					1	ACG CAG CGC Thr Gln Arg	! .	ACC GA	•	CAC AA		VAC CA	!	3rc	•	orc TA Val Ty	•	GGT GGA GGA	linker	CAA GC		
	200	CTG AGC Leu Ser	590	GGT GGG C	- linker 680	GGG 7		GTG /	090	AGA (	950	CTC	1040	ACA (	1130	CAG (	1220	GG 4	1310	CTT (		
		GTG CT Val Le		GA GGT	i	CC AAC	IAβ ⁴ (B1)	GC GCC		GCG TGC AGA CAC AAC TAC Ala Cys Arg His Asn Tyr	٠,	AG GCC	1	מוני פוני	=	.AG GG/ 31n G13	·	AGC AAG GGA Ser Lys Gly	] .	IGG AAV		
		G A'IG Bu Met'	-	GAC	Ť	TAC A		TAC C		ACG G		ACA O	- IAB (PE) : 1030	CVG C		CAT		CGG /		AAG 1		
	490	GTC CT Val Le	282 * 580 *	AGC TGG GAC GGA Ser Trp Asp Gly	670	GC TAC	760	Sec GAC	850	TG GAC	940	TCC AGG Ser Arg	<u>₹</u> 6	AGG AAT GGC CAG GAG GAG ACA GTG Arg Asn Gly Glu Glu Thr Val	1120	ATG ACC CCT CAT CAG GGA GAG GTC TAC ACC Met Thr Pro His Gln Gly Glu Val Tyr Thr	1210	GAG TCT GCC CGG Glu Ser Ala Arg	1300	CAG CTC	ا . يو	
	_	rc crc	i L	GGC 7		GAG 1		CTG C	•	S.GAG C	•	CTG		Arg /		3 ATG 2		c GAG :		C GCT	: basiqu	
	480	GCT GTG GTG CTG ANG GTG Ala Val Val Val Val Val CENTER:	570 570	orc acc	099	NAG GGC Lys Gly	750	AGC GAG Ser As	840	SGG GCC Arg Ale	930	ATC TCC 1le Ser	1020	rcc tro Trp Ph	1110	CTG GAG Leu Glu	1200	CAG TC	1290	AAG AA	glissière à leucine basique	
		CA GCT er Ala	•	c GTG (e val	!.	G TTC n Phe	•	C GAC	•	A ACG		C GCC		G CGC	•	C ATG	•	G GCA g Ala	•	G AMA	ssière à	
	470	CAG ATC CCC AGC CTC CTC TCA GCT GCT GTG GTG GTG GTG GTG GTG GTG GTG	260	TGG CCG TCG CTG GAG CAC CCG ATC GTG GTG TCC GGC AGC TGG GAC GGA GGT GGG GGC Ser Pro Ser Leu Glu His Pro Ile Val Val Ser Gly Ser Trp Asp Gly Gly Gly Gly	650 650	TCC GAA AGG CAT (TTC GTG GTC CAG TTC AAG GGC GAG TGC TAC TAC ACC AAC GGG SET GIU ANG His Phelval Val Gln Phe Lys Gly Glu Cys Tyr Tyr Thr Asn Gly	740	AAC CGG GAG GAG TAC GTG CGC TAC GAC AGC GTG GGC GAG TAC CGC GCG GTG ACC GAG CTG A8n Arg Glu Glu Tyr Val Arg Tyr Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg Ala Val Thr Glu Leu	830	AGC CAG CCG GAG ATC CTG GAG CGA ACG CGG GCC.GAG GTG GAC ACG Ser GIn Pro Glu Ile Leu Glu Arg Thr Arg Ala Glu Val Asp Thr	920	CTT GAA CAG CCC AAT GTC GCC ATC TCC Leu Glu Gln Pro Asn Val Ala 11e Ser	1010	ACA GAT TTC TAC CCA GCC AAG ATC AAA GTG CGC TGG TTC AGG AAT GGC CAG GAG GAG ACA GTG Thr Asp Phe Tyr Pro Ala Lys Ile Lys Val Arg Trp Phe Arg Asn Gly Glu Glu Glu Thr Val	1100	CTG GTC Leu Val	1190	ATC ACT GTG GAG TGG AGG GCA CAG TCC GAG TCT GCC CGG AGC AAG GGA GGT GGA GGA Ile Thr Val Glu Trp Arg Ala Gln Ser Glu Ser Ala Arg Ser Lyg Gly Gly Gly Gly	1280	ANG ANA TTG CAN GCA CTG ANG ANA ANG ANC GCT CAG CTG ANG TGG ANA CTT CAA GCC CTC LYS LYS Leu Gln Ala Leu Ivs Lys Lys Asn Ala Gln Leu Lys Trp Lys Leu Gln Ala Leu	1370 glii	႘ၟ
	•	TC CTC	•	G CAC	ACK (15)	c Gre	•	C GrG	•	c CTG	•	IG CCC		NG AYPC	•		•	rc GAG	•	NA GCA In Ala		rccacc ¹ Sall
	460	Ser l	\$50	CTG G/ Leu G	PEPTIDE LACK (158-73) 640 65	CAT (TI	730	GAG T/ Glu T/	820	CAG CCG GAG ATC Gln Pro Glu Ile	910	GAA C	1000	GCC A	1090	TGG ACC 1TC CAG GTC Trp Thr Phe Gln Val	1180	ATC ACT GTG 11e Thr Val	1270	TTG C.	1360	ાં
	•	NTC CCC	•	C TCG	E	AN ANG	•	G GAG	•	NG CCG In Pro	.=	CGG CTT	`` <u>*</u> •	AC CCA	•	TGG ACC 1TC Trp Thr Phe	•	CCC ATC Pro 11e	•	AG AAA ys Lys	. •	CAT CAT CAT TGA His His His ***>
	450		540	TCG Ser	630	TCC	02.		810		006	CGG	066	TTC T	1080	GλC Λsp	1170	AGC Se r	1260	AAA Lys	1350	
		ATG GCT CTG Met Ala Leu		TGC TTC Cys Phe		TCT GGA GGT GGA GGC Ser Gly Gly Glv Gly	•	ACC AGA TAC ATC TAC Thr Arg Tyr Ile Tyr	•	GAG TAC TGG AAC	•	CCG GAG ACC AGC ACC TCC CTG Pro Glu Thr Ser Thr Ser Len		ACA GAT Thr Asp		CTT ATT AGG AAT GGG Leu Ile Arg Asn Gly		GAG CAT CCC AGC CTG AAG Glu His Pro Ser Leu Lys		AG TTG In Leu		AAA CTC GCC CAG CAT CAT CAT Lys Leu Ala Gln His His His
	440	Fet S	530	ATC T	620	GGA GGT GGA GGC Gly Gly Glv Gly	710 linker	TAC A Tyr I	900	TAC T	980	AGC ACC TO Ser Thr S	980	TCG GTG A Ser Val T	1070	ACG A	1160	Ser L	1250	CCA TCA GCT CAG Pro Ser Ala Gln	1340	AG CAT O
0,	•	<u>C</u> TTAGA U	<b>5</b> 0	AC TCC sn Ser	61 6 1 •	TCT GGA Ser Gly		CC AGA hr Arg	<b>.</b>		œ •	ACC AGC Thr Ser		TCT TCG Cys Ser	20.	CAG CTT ATT AGG Gln Leu Ile Arg	Ξ.	INT CCC	. 12	CA TCA	; ;	SCC CAG
to 13	430	GGAATTCT ECORU		GGC GGA AAC Gly Gly Asn	ŀ	630 61y		CTG Val		CCA GAC GCC Pro Asp Ala		GAG A				CAG Gln		GAG G		Ala F	_	CTC C
e: 420	•	AAAGGGGGAATTCTTAGAG ATG GCT CTG  BCORI  Het Ala Leu	520	GAG GGC GGA AAC TCC ATC TGC Glu Gly Gly Asn Ser Ile Cys	610	CCC CGA Pro Arg	700	CGG CTC Arg Leu	790	CGG CCA Arg Pro	880	GGG CCG Gly Pro	970	ACT CTG GTC Thr Leu Val	1060	TCC ACA Ser Thr	1150	CAT GTG GAG CAT CCC AGC CTG AAG His Val Glu His Pro Ser Leu Lys	1240	ACT ACA GCT CCA TCA GCT CAG TTG Thr Thr Ala Pro Ser Ala Gln Leu	1330	AAG AAA Liys Liys
Sequence Range: 420 to 1370	420	2	•	00	•	اتقات	•	Ūά	•	ΰŸ	•	<b>&amp;</b> &		₹Ē	•	Ėν	•	UΞ	-	<u>&lt; + `</u>	•	نـ ۲
equenc														•		•						
C)																						

FIGURE 4



### FIGURE 5





# FIGURE 6

